PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07D 493/10, G01N 33/533, C07F 7/18, 9/38, C07J 1/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/14696**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. April 1997 (24.04.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04506

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Oktober 1996 (17.10.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 38 708.2 18. Oktober 1995 (18.10.95) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HEINDL, Dieter [DE/DE]; Hohenschwangaustrasse 37, D-81549 München (DE). JOSEL, Hans-Peter [DE/DE]; Prälatenweg 7, D-82362 Weilheim (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23, D-82362 Weilheim (DE). HÖLTKE, Hans-Joachim [DE/DE]; Henlestrasse 2, D-82377 Penzberg (DE). BECKERT, Rainer [DE/DE]; Am Mühlhügel 16, D-07751 Jena-Wogau (DE). WEISS, Dieter [US/DE]; Clara-Zetkin-Strasse 1, D-07743 Jena (DE). ADAM, Waldemar [DE/DE]; Lerchenhain 4, D-97074 Würzburg (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

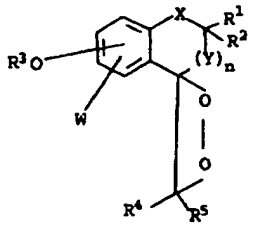
Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: HETEROCYCLIC DIOXETHANE SUBSTRATES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USE

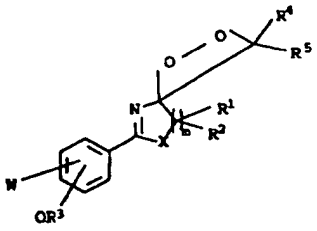
(54) Bezeichnung: HETEROCYCLISCHE DIOXETAN-SUBSTRATE, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention concerns compounds of general formulae (Ia) and (Ib), in which R^1 and R^2, which may be identical or different, designate hydrogen, C_1-C_6 lower alkyl, straight-chain or branched, or an aryl group, optionally substituted by electron-attracting groups, R^3 means a cleavable group, W designates hydrogen, halogen or a pseudohalogen, at least one of the groups R^4 and R^5 designates a group stabilizing the dioxethane structure, at most one of the groups R^4 and R^5 designating hydrogen, and X or Y designating oxygen, N-R or $C(R)_2$, R having the meanings given for R^1 or R^2, or a mesomeric double bond or a carbonyl group, and n being 0 or 1 and m being 1 or 2. The invention further concerns a process for preparing these compounds. The compounds are novel and can be used as substrates in immunological assays and DNA diagnoses using colour-forming activating agents.



(Ia)



(Ib)

(57) Zusammenfassung

Es werden Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia) and (Ib), in der R^1 und R^2 gleich oder verschieden, Wasserstoff, Niederalkyl C_1 bis C_6, geradkettig oder verzweigt, oder eine Arylgruppe, gegebenenfalls substituiert durch elektronenziehende Gruppen, darstellen, R^3 eine abspaltbare Gruppe bedeutet, W Wasserstoff, Halogen oder ein Pseudohalogen, mindestens eine der Gruppen R^4 oder R^5 eine die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe, wobei höchstens eine der Gruppen R^4 oder R^5 Wasserstoff darstellt, und X oder Y Sauerstoff, N-R oder $C(R)_2$, wobei R die für R^1 bzw. R^2 angegebenen Bedeutungen haben oder eine mesomere Doppelbindung oder eine Carbonylgruppe darstellt, und n die Zahl 0 oder 1 bzw. m die Zahl 1 oder 2 bedeutet, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung beschrieben. Diese Verbindungen sind neu und als Substrate in immunologischen Assays und in der DNA-Diagnostik unter Verwendung von aktivierenden Agentien zur Farbbildung verwendbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MX**	Mexiko
AT	Österreich	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
AU	Australien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BB	Barbados	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BE	Belgien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BF	Burkina Faso	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BG	Bulgarien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BJ	Benin	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
BR	Brasilien	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
BY	Belarus	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CA	Kanada	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KR**	Republik Korea	**SG**	Singapur
CG	Kongo	**KZ**	Kasachstan	**SI**	Slowenien
CH	Schweiz	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CM	Kamerun	**LR**	Liberia	**SZ**	Swasiland
CN	China	**LK**	Litauen	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
EE	Estland	**MG**	Madagaskar	**UG**	Uganda
ES	Spanien	**ML**	Mali	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**MN**	Mongolei	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MR**	Mauretanien	**VN**	Vietnam
GA	Gabon	**MW**	Malawi		

HETEROCYCLISCHE DIOXETAN-SUBSTRATE, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND VERWENDUNG IN ENZYMATISCHEN ANALYSE-VERFAHREN

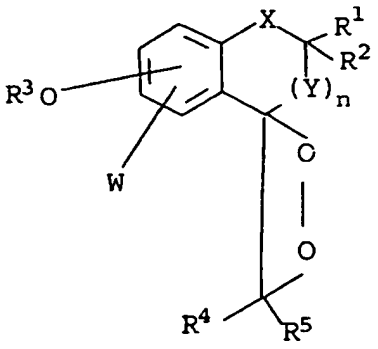
Gegenstand der Erfindung sind heterocyclische Dioxetan-Substrate, Verfahren zur Herstellung und Verwendung in enzymatischen Analyseverfahren.

Es ist seit längerem bekannt, daß durch die Umsetzung von Luciferin mit Luciferase, Sauerstoff und ATP Oxiluciferin entsteht. Bei dieser Reaktion wird Licht (Wellenlängenmaximum bei 562 nm) als Chemilumineszenz emittiert. Als energiereiches Zwischenprodukt entsteht dabei vermutlich ein Dioxetan (F. McCapra, Chem. Commun. 155 (1968)). Aufgrund dieses Postulats wurden eine Vielzahl von chemilumineszierenden 1,2-Dioxetan-Verbindungen entwickelt.

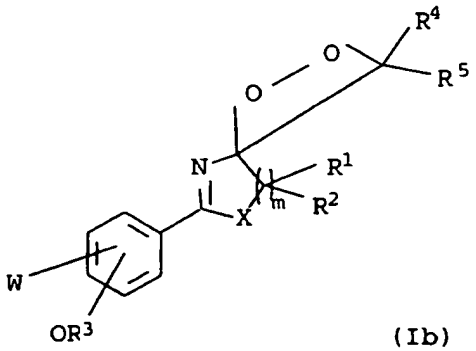
Zur Stabilisierung der an sich instabilen 1,2-Dioxetane wurde der Adamantyl-Rest beschrieben (EP-A 0 254 051, EP-A 0 352 713, WO 91/03479, WO 90/07511, WO 92/04341 sowie dort zitierte Publikationen). Die Chemilumineszenzausbeute entwickelt sich dann mit Zerfall der Dioxetane und ist unter anderem von den Fluoreszenzeigenschaften des gebildeten Emitters abhängig. Die beim Zerfall der üblicherweise verwendeten Dioxetan-Derivate (3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy) phenyl-1,2-Dioxetan bzw. entsprechende am Adamantylrest halogenierte Dioxetane) gebildeten Phenolate weisen zwar eine gute Fluoreszenzquantenausbeute auf, die Substrate zeigen jedoch eine insgesamt niedrige Chemilumineszenz. Insbesondere wären Dioxetane mit verbesserten Chemilumineszenzausbeuten beim getriggerten Zerfall der Dioxetane wünschenswert.

Aus WO 93/20083 sind stabilisierte Dioxetan-Derivate bekannt, die in Oxyluciferin bzw. Phenylthiazolinderivate als Emitter zerfallen. Diese Dioxetane zerfallen zwar mit einer höheren Lichtausbeute als andere bekannte Dioxetane, sind jedoch synthetisch nur schwer zugänglich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, neue 1,2-Dioxetane zur Verfügung zu stellen, welche stabil sind und erst durch Umsetzung mit einem aktivierenden Agens unter Bildung hoher Lichtausbeute zerfallen sowie durch relativ einfache chemische Synthese zugänglich sind. Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Verbindung der allgemeinen Formel Ia oder Ib,



(Ia)



(Ib)

in der

R^1 und R^2 jeweils gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Niederalkyl C_1 bis C_6, geradkettig oder verzweigt, jeweils oder zusammen eine Cycloalkyl- bzw. Arylgruppe mit gegebenenfalls einer oder mehreren substituierten elektronenziehenden Gruppen mit der Maßgabe darstellen, daß nur einer der Reste R^1 oder R^2 Wasserstoff ist,

m die Zahl 1 oder 2 bedeutet,

R^3 eine abspaltbare Gruppe, die durch ein aktivierendes Agens abgespalten werden kann,

W Wasserstoff, Halogen oder ein Pseudohalogen wie Rhodanid-oder Cyanidreste ist und bevorzugt in ortho-Stellung zur O-R^3-Gruppe steht,

mindestens eine der Gruppen R^4 oder R^5 eine die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe und höchstens eine der Gruppen R^4 oder R^5 Wasserstoff darstellt,

und X bzw. Y Sauerstoff, N-R oder $C(R)_2$, wobei R die für R^1 bzw. R^2 angegebenen Bedeutungen haben bzw. eine Doppelbindung im mesomeren System ist, oder eine Carbonylgruppe darstellt, und n die Zahl 0 oder 1 bedeutet.

Als aktivierende Agentien werden vorzugsweise Säuren, Basen, Salze, Enzyme, anorganische oder organische Katalysatoren und Elektronendonoren verwendet.

Die Gruppe -O-R^3 kann an jeder Position des Phenylrings lokalisiert sein. Wenn X Sauerstoff ist, ist die Gruppe-O-R^3 im Fall der Verbindungen der allgemeinen Fromel Ia und n gleich Null vorzugsweise in 5-Stellung angeordnet, im Fall von Ib und m gleich 1 in 3- und von Ib und m gleich 2 in 4-Stellung.

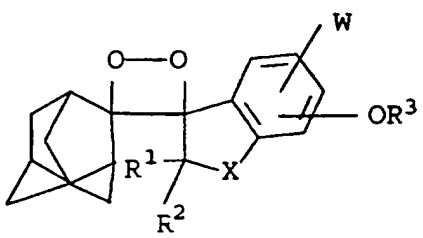
Die Gruppe -O-R^3 ist vorzugsweise das Hydroxysalz einer Oxysäure, Phosphat, Aryl- oder Alkylcarboxylester, Alkyloxy, Alkylsilyloxy oder Arylsiloxy, Sulfat, Oxypyranosid oder ein

Glyceridyl- bzw. Phosphorylrest oder ein Steroidderivat. Besonders bevorzugt sind für -O-R^3 Phosphat sowie die Dimethyl-tertiärbutyl-silyloxygruppe.

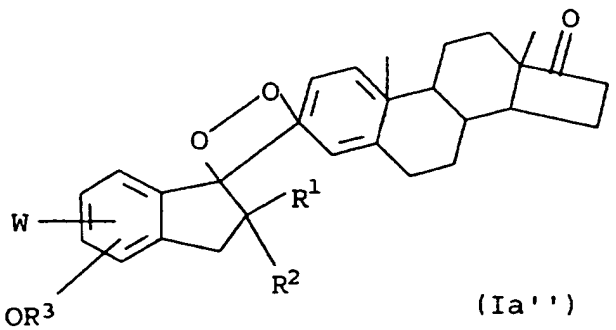
Die Zusammensetzung der Aryl- und Alkylreste ist unkritisch. Die Auswahl geeigneter Reste R^3 ist jedem Fachmann ohne weiteres möglich. Es muß lediglich Löslichkeit und Abspaltbarkeit von R^3 durch die aktivierenden Agenzien möglich sein.

Bevorzugt sind für R^1 und R^2 Wasserstoff, Methyl-, Ethyl- oder Phenylgruppen bzw. wenn R^1 und R^2 zusammen eine mit $(C)_m$ und m gleich 2 eine Phenylengruppe bedeutet, wobei die Phenyl- bzw. Phenylengruppen beispielsweise durch einen Halogenrest substituiert sein können. Wird beispielsweise Phosphat als -O-R^3 verwendet, so kann die Chemilumineszenzreaktion durch Zusatz von alkalischer Phosphatase induziert werden. Bei Einsatz des Galaktosids kann die Chemilumineszenzreaktion durch ß-Galaktosidase induziert werden. Wird ein Silyloxyrest als -O-R^3 verwendet, so kann die Zugabe von Fluorid die Chemilumineszenz induzieren.

Als Dioxetanstruktur-stabilisierende Gruppen R^4 und/oder R^5 geeignet sind Gruppen, welche die Dioxetangruppe vor unkontrollierter Umsetzung schützen. Diese Stabilisierung erfolgt vorzugsweise durch sterische Abschirmung dieser Gruppe. Daher kommen insbesondere kondensierte aliphatische oder aromatische Ringsysteme, die gegebenenfalls durch elektronenziehende Gruppen substituiert sein können, für diesen Zweck in Betracht. Als elektronenziehende Gruppen können beispielsweise Carbonyl oder Halogen eingesetzt werden. Geeignet sind beispielsweise Adamantanyl-, Phenyl-, Cyclohexyl-, sekundäre und tertiäre aliphatische Alkylgruppen (wie z.B. die t-Butylgruppe) in substituierter und unsubstituierter Form. Dabei können R^4 und R^5 gleich oder verschieden sein. Im Fall von Phenyl- und/oder Cyclohexylgruppen kommen sowohl einzelne Reste als auch in Form von kondensierten Ringsystemen als Substituenten in Betracht, die gegebenenfalls weitere Struktureinheiten, wie z.B. einen Cyclopentylrest wie in Steroiden, aufweisen können. Entsprechende Reste werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Polycycloalkyl- bzw. Polycycloarylreste zusammengefaßt. Im Falle des Adamantylrests bzw. beispielsweise eines Steroidylrests ist dieser vorzugsweise so gebunden, daß R^4 und R^5 Teile der Ringstruktur bedeuten und demnach überbrückt sind (Formeln Ia' bzw. Ia''):



(Ia')



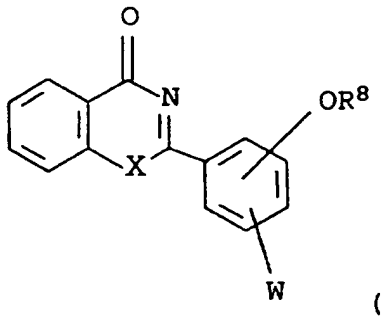
(Ia'')

Als besonders geeignet haben sich erfindungsgemäß die Dioxetane der Benzofurane herausgestellt:

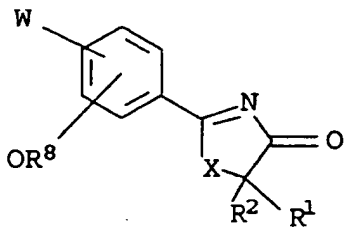
3-(7'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}] yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(7'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro-(tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, 3-(7'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(7'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(5"-chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, 3-(5'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(5'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, 3-(5'-t.-Butyldimethylsilyloxy-6'-chlor-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro -(5"-chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(5'-Phosphoryl-6'-chlor-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, (4'Ξ)-5"-t.-Butyldimethylsilyloxy-6"-Chlor-2",2"-dimethyl-17-oxo-(3ξO)-dispiro [androsta-1,4-dien-3,3'-[1,2]dioxetan-4',3"-benzofuran oder (4'Ξ)-6"-Chlor-2",2"-dimethyl-17-oxo-(3ξO)-dispiro[androsta-1,4-dien-3,3'-[1,2]dioxetan-4',3"-benzofuran-5"-yl-dinatriumphosphat.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib sind neu. Ein Syntheseverfahren für diese Verbindungen ist bisher nicht bekannt.

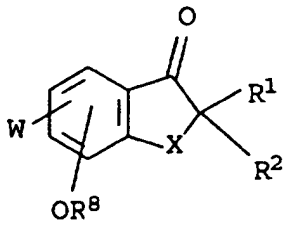
Gegenstand der Erfindung ist demnach auch ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel Ia bzw. Ib, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man heterocyclische Carbonylverbindungen der allgemeinen Formeln II, III oder IV



(II)

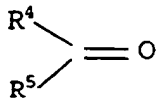


(III)



(IV)

in der R^8 einen Alkylrest, geradkettig oder verzweigt mit 1 bis 6 C-Atomen, vorzugsweise ein Methylrest, oder ein Wasserstoffatom darstellt, W ein Halogen- oder Pseudohalogenrest, wie beispielsweise SCN oder CN, oder ein Wasserstoffatom darstellt, X Sauerstoff oder N-Alkyl darstellt und die Reste R^1 und R^2 die oben genannten Bedeutungen haben, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (V)



(V)

in der R^4 und R^5 die oben genannten Bedeutungen haben, unter Wasser und Luftausschluß in Gegenwart von Titantrichlorid und einem Reduktionsmittel umsetzt, das Reaktionsprodukt für R^8 gleich Alkyl in Gegenwart von beispielsweise Bortrijodid bzw. Natriumethanthiolat dealkyliert bzw., wenn R^8 Wasserstoff bedeutet, direkt nach einer dem Fachmann geläufigen Methode die abspaltbare Gruppe R^3 einführt und anschließend zum Dioxetan dioxigeniert.

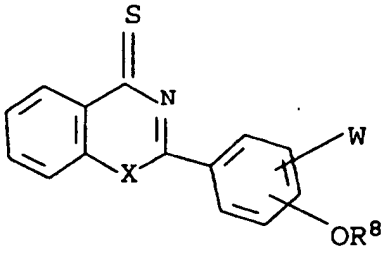
Die heterocyclischen Carbonylverbindungen werden nach in der Literatur beschriebenen Methoden hergestellt, vgl. z.B. Tetrahedron 1978, 34, 2035; Helv. Chim. Acta 1972, 55, 1567; J. Agric. Food. Chem. 1968, 300; J. Am. Chem. Soc. 1967, 87, 6527.

Die Umsetzung der Verbindungen II, III und IV mit der Verbindung V erfolgt in einem möglichst unpolaren Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran oder Dimethoxyethan, in Gegenwart von Titantrichlorid und einem Reduktionsmittel, vorzugsweise Zink/Kupfer oder Lithiumaluminiumhydrid. Als Verbindung V sind insbesondere solche Aldehyde und Ketone geeignet, die das Endprodukt, das Dioxetan stabilisierende Reste R^4 und R^5 aufweisen. Eine solche Stabilisierung kann durch sterische Abschirmung der Dioxetanstruktur erfolgen. Geeignete Ketone und Aldehyde sind demnach beispielsweise Adamantanon, polycyclische Ketone, wie z.B. ein Steroidketon, sekundäre und tertiäre aliphatische Ketone und Aldehyde, wie z.B. die t-Butylketon. Diese Ketone können weitere Substituenten, bevorzugt Chloratome, tragen.

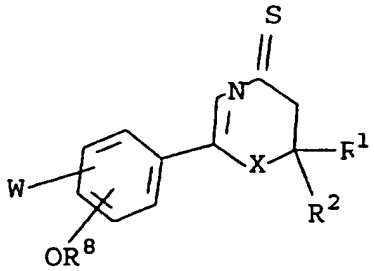
Bei Verbindungen, in denen R^8 ein Alkylrest, vorzugsweise Methyl bedeutet, erfolgt die Dealkylierung zweckmäßig durch ein Dealkylierungsmittel, vorzugsweise mit Bortrijodid oder Natriumethanthiolat.

Ebenso können die heterocyclischen Ketone II, III und IV in die heterocyclischen Thione der allgemeinen Formeln VI, VII bzw. VIII überführt werden, in der R^8 und W, X und R^1 und R^2 die oben genannten Substituenten darstellen, anschließend mit Diazoverbindungen der allgemeinen Fromel IX, in der R^4 und R^5 die oben genannten Bedeutungen haben, umgesetzt werden. Die gebildeten Alkene werden für R^8 gleich Methyl, nach dem oben angegebenen Ver-

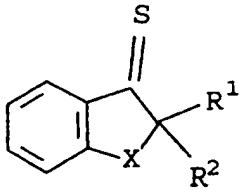
fahren dealkyliert. Anschließend erfolgt, wie nachstehend beschrieben, die Einführung der abspaltbaren Gruppe R^3 und Dioxygenierung.



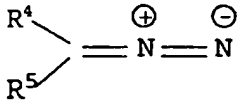
(VI)



(VII)



(VIII)



(IX)

Die Umwandlung der Carbonylfunktion in eine Thiocarbonylfunktion erfolgt durch Umsetzung der heterocyclischen Ketone mit einem Schwefelungsreagenz, bevorzugt Lawesson-Reagenz (2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan-2,4-disulfid) oder Phosphorpentasulfid, im Toluol oder Pyridin.

Die Umsetzung mit Diazokomponenten, beispielsweise mit Di-tertiär-butyldiazomethan oder mit einem Diazosteroid erfolgt bevorzugt in einem unpolaren Lösungsmittel, wie Diethylether. Die Diazokomponente wird durch Oxidation der Hydrazone mit einem Oxidationsmittel, bevorzugt Mangandioxid oder Silberoxid hergestellt. Als Verbindung IX sind vorzugsweise Diazoverbindungen geeignet, die durch die Reste R^4 und R^5 das Dioxetan stabilisieren. Eine solche Stabilisierung kann durch sterische Abschirmung der Dioxetanstruktur erfolgen. Geeignete Diazoverbindungen sind demnach beispielsweise Diazoadamantan, Chlordiazoadamantan, Diphenyldiazomethan, polycyclische Diazoverbindungen, wie z.B. eine Diazosteroid, sekundäre und tertiäre aliphatische Ketone und Aldehyde, wie z.B. di-tert.-Butylketon. Diese Diazoverbindungen können weitere Substituenten, bevorzugt Chloratome, tragen.

Die Einführung der abspaltbaren, chemisch labilen Gruppe erfolgt nach dem Fachmann geläufigen Methoden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Houben Weyl XII/2.

Die Dioxygenierung erfolgt zweckmäßig durch Umsetzung des Alkens, das entweder in Methylenchlorid oder in Methanol gelöst wird, bei einer Temperatur von ungefähr -30 bis -10°C mit Singulettsauerstoff, der durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht unter Verwendung eines

Sensitizers (Rose Bengal, Methylenblau, vgl. Tetrahedron Letters 1988, 3137-3140) in situ gebildet wird.

Die Aufreinigung erfolgt insbesondere durch Filtration bzw. andere dem Fachmann geläufige Methoden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung einer Säure, Base eines Salzes, Enzyms, anorganischen oder organischen Katalysators und Elektronendonors durch Umsetzung dieser Verbindung mit einer Verbindung der allgemeinen Formel Ia oder Ib und Messung des emittierten Lichts als Maß für den Gehalt an der zu bestimmenden Verbindung.

Besonders bevorzugt wird dieses Verfahren verwendet zur Bestimmung von Enzymen, speziell von Markerenzymen in immunologischen Systemen oder zur DNA-Diagnostik mit markierten DNA-Sonden. Bevorzugt wird alkalische Phosphatase bestimmt, wobei die chemisch labile Gruppe R^3 Phosphat ist oder ß-Galaktosidase, wobei R^3 ein Galaktosid ist.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert:

Beispiel 1

2-(4'-Methoxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on

Zu einer Suspension von 0.25 mol Salicylamid in 50 ml Xylol werden 2.5 ml Pyridin gegeben. Unter Sieden am Rückfluß (Wasserabscheider) werden innerhalb von 3 h 0.26 mol 4-Methoxybenzoylchlorid gegeben und weitere 3h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Es werden weitere 2.5 ml Pyridin zugegeben und weitere 8 h erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wird auf 400 ml Isopropanol gegossen und abgesaugt. Der Rückstand wird aus Ethylenglykolmonomethylether umkristallisiert.

Ausbeute 0.2 mol

Beispiel 2

4-Adamantyliden-2-(4'-methoxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin

Zu einer Suspension von 40 mmol Titantrichlorid in 100 ml abs. THF werden unter kräftigen Rühren vorsichtig 21 mmol Lithiumaluminiumhydrid gegeben. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemp. wird unter Eiskühlung eine Mischung von 15 mmol 2-(4'-Methoxyphenyl)-4H-1,3 benzoxazin-4-on und 11 mmol Adamantanon gegeben. Es wird 60 min unter Rückfluß

zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird aur 200 ml Wasser gegossen. Die Mischung wird zweimal mit je 200 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit Wasser gewaschen und abgetrennt. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester/Petroläther 1 : 9) getrennt.

Ausbeute 6 mmol

Beispiel 3

4-Adamantyliden-2-(4'-hydroxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin

Unter Rühren wird bei - 25 °C unter Luft und Wasserausschluß eine Lösung von 6 mmol 4-Adamantyliden-2-(4'-methoxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin in 20 ml abs. Methylenchlorid zu einer Lösung von 12 mmol Bortrijodid getropft. Die Mischung wird innerhalb einer Stunde auf Raumtemp. erwärmt und weitere 4 h gerührt. Nach Versetzen mit 50 ml Wasser wird die organische Phase abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester/Petroläther 1 : 3) getrennt.

Ausbeute 3.2 mmol

Beispiel 4

4-Adamantyliden-2-(4'-t.-butyldimethylsilyloxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin

3 mmol 4-Adamantyliden-2-(4'-hydroxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin werden in 30 ml abs Methylenchlorid suspendiert. Es werden nacheinander 6 mmol Imidazol und 6 mmol t. -Butyldimethysilylchlorid zugegeben. Nach 14 h Rühren bei Raumtemp. wird filtriert. Das Filtrat wird nacheinander mit je 20 ml 1 M Natronlauge, 20 ml 2 M Salzsäure und 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die abgetrennte organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand wird aus wenig Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute 2.7 mmol

Beispiel 5

Dinatriumsalz von 4-Adamantyliden-2-(4'-phosphoryl-phenyl)-4H-1,3-benzoxazin

Eine Lösung von 3 mmol 4-Adamantyliden-2-(4'-hydroxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin in einer Mischung von 3 ml Aceton und 3 ml Pyridin wird unter Rühren bei 0 °C zu einer Lösung von 1.5 ml Phosphoroxychlorid in 7.5 ml Aceton getropft. Es wird 1 h bei 0°C gerührt und anschließend auf 60 ml gesättigte Kochsalzlösung gegossen und abgesaugt. Der Rückstand wird in 1.5 ml Wasser suspendiert. Mit 2 M Natronlauge wird ein pH-Wert von 10 eingestellt. Es wird mit 30 ml Ethanol versetzt und abgesaugt. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 2.2. mmmol

Beispiel 6

3-[2'-(4"-t. Butyldimethylsilyloxyphenyl)-4'H-1,3-benzoxazin-4'-yl]-4-spiroadamantyl-dioxetan

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 2 mmol 4-Adamantyliden-2-(4'-t.-butyldimethylsilyloxyphenyl)-4H-1,3-benzoxazin gelöst in 20 ml abs. Methylenchlorid in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 2 mmol

Beispiel 7

Dinatriumsalz des 3-[2'-(4"-phosphoryl-phenyl)-4'H-1,3-benzoxazin-4'-yl]-4-spiroadamantyl-dioxetan

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 2 mmol des Dinatriumsalzes von 4-Adamantyliden-2-(4'-phosphoryl-pheny)l-4H-1,3-benzoxazin gelöst in 20 ml abs. Methanol in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 2 mmol

Beispiel 8:

2-(3'-Methoxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin-4-on

Zu einer Lösung von 57 mmol Kaliumcyanid in 50 ml Wasser werden bei 0 °C 50 mmol Aceton gegeben. 57 mmol 3-Methoxybenzoylchlorid werden innerhalb 90 min unter kräftigem Rühren zugetropft. Nach weiteren 90 min Rühren bei 0 °C wird 10 h bei Raumtemp stehengelassen. Es wird mit 100 ml Diethylether versetzt und die Mischung zweimal mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand (6.6 g 3-Methoxybenzoesäure-2'-cyanoisopropylester) wird im Hochvakuum getrocknet und anschließend in eine Mischung von 52 ml Acetanhydrid mit 10.4 ml 35 % wäßriger Tetrafluorborsäure eingetragen. Es wir 1 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemp. mit 300 ml Ether versetzt. Der entstandene Niederschlag wird in 70 ml Toluol suspendiert. Zu der Suspension werden 70 mmol Triethylamin gegeben und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird abfiltriert. Das Filtrat wird bis zur Trockene im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester /Petroläther 1 : 1) getrennt

Ausbeute 17 mmol

Beispiel 9

4-Adamantyliden-2-(3'-methoxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin

Zu einer Suspension von 35 mmol Titantrichlorid in 60 ml abs. THF werden unter kräftigen Rühren vorsichtig 122 mmol Zink-Kupfer-Couple gegeben. Nach einstündigem Erhitzens unter Rückfluß wird nach Abkühlen auf Raumtemp. eine Mischung von 11.4 mmol 2-(3'-Methoxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin-4-on und 8.1 mmol Adamantanon gegeben. Es wird 4 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird auf 200 ml Wasser gegossen. Die Mischung wird zweimal mit je 200 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit Wasser gewaschen und abgetrennt. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester/ Petroläther 1 : 9) getrennt.

Ausbeute 7 mmol

Beispiel 10

4-Adamantyliden-2-(3'-hydroxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin

Unter Rühren wird bei - 25 °C unter Luft und Wasserausschluß eine Lösung von 7 mmol 4-Adamantyliden-2-(3'-methoxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin in 20 ml abs. Methylenchlorid zu einer Lösung von 14 mmol Bortrijodid getropft. Die Mischung wird innerhalb einer Stunde auf Raumtemp. erwärmt und weitere 4 h gerührt. Nach Versetzten mit 50 ml Wasser wird die organische Phase abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester/Petroläther 1 : 3) getrennt.

Ausbeute 3.9 mmol

Beispiel 11

4-Adamantyliden-2-(3'-t.butyldimethylsilyloxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin

3 mmol 4-Adamantyliden-2-(3'-hydroxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin werden in 30 ml abs Methylenchlorid suspendiert. Es werden nacheinander 6 mmol Imidazol und 6 mmol t. -Butyldimethysilylchlorid zugegeben. Nach 14 h Rühren bei Raumtemp. wird filtriert. Das Filtrat wird nacheinander mit je 20 ml 1M-Natronlauge, 20 ml 2 M-Salzsäure und 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die abgetrennte organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel:Petroläther) getrennt.

Ausbeute 2. 5 mmol

Beispiel 12

Dinatriumsalz von 4-Adamantyliden-2-(3'phosphorylphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin

Eine Lösung von 3 mmol 4-Adamantyliden-2-(3'-hydroxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin in einer Mischung von 3 ml Aceton und 3 ml Pyridin wird unter Rühren bei 0°C zu einer Lösung von 1.5 ml Phosphoroxychlorid in 7.5 ml Aceton getropft. Es wird 1 h bei 0°C gerührt und anschließend auf 60 ml gesättigte Kochsalzlösung gegossen und abgesaugt. Der Rückstand wird in 1.5 ml Wasser suspendiert. Mit 2M-Natronlauge wird ein pH-Wert von 10 eingestellt. Es wird mit 30 ml Ethanol versetzt und abgesaugt. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 2.0 mmol

Beispiel 13

3-[2'-(3"-t. Butyldimethylsilyloxyphenyl)-5',5'-dimethyl-oxazolin- 4'-yl]-4-spiroadamantyl-dioxetan

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 2 mmol 4-Adamantyliden-2-(3'-t.-butyldimethylsilyloxyphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin gelöst in 20 ml abs. Methylenchlorid in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 2 mmol

Beispiel 14

Dinatriumsalz des 3-[2'-(3"-Phosphorylphenyl)-5',5'-dimethyl-oxazolin-4'-yl}-4-spiroadamantyl-dioxetan

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 2 mmol Dinatriumsalz von 4-Adamantyliden-2-(3'phosphorylphenyl)-5,5-dimethyl-oxazolin gelöst in 20 ml abs. Methanol in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 2 mmol

Beispiel 15

7-Hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-on

7-Hydroxy-2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran werden in 100 ml Pyridin gelöst. Bei 0 °C wird innerhalb von 4 h 0.5 mol Benzoylchlorid zugetropft. Anschließend wird 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird auf 200 ml Eiswasser gegossen und abgesaugt. Der Rückstand wird mit 500 ml 2 M Salzsäure und dann mit 1000 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Zu einer Lösung dieses Rohprodukts (0.45 mol) wird in 600 ml Eisessig wird eine Lösung von 0.906 mol Chromtrioxid in 370 ml Eisessig so zugetropft, daß die Temperatur der Mischung 20 °C nicht überschreitet. Nach beendetem Zutropfen wird noch 1 h bei 40 °C ge-

rührt und anschließend auf 2l Wasser gegossen. Es wird abgesaugt. Der Rückstand wird mit 1 L Wasser gewaschen und aus Ethanol/ Wasser 3 : 1 umkristallisiert. Die Benzoylverbindung wird in 400 ml 10 % ethanolische Kaliumhydroxidlösung eingetragen und die Mischung 1 h auf 70 °C erwärmt. Es wird mit 3 l Wasser versetzt und abgesaugt. Der Rückstand wird aus 2 l Wasser umkristallisiert.

Ausbeute 0.16 mol

Beispiel 16

3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran

Zu einer Suspension von 158 mmol Titantrichlorid in 120 ml abs. THF werden unter kräftigen Rühren vorsichtig 550 mmol Zink-Kupfer-Couple gegeben. Nach einstündigem Erhitzens unter Rückfluß wird bei Raumtemp. eine Mischung von 52 mmol 7-Hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3 on und 37 mmol 5-Chloradamantan-2-on gegeben. Es wird 30 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird auf 200 ml Wasser gegossen. Die Mischung wird zweimal mit je 200 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit Wasser gewaschen und abgetrennt. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester/Petroläther 1 : 9) getrennt.

Ausbeute 30 mmol

Beispiel 17

3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-t.-butyldimethylsilyloxy-2,2-dimethyl-benzofuran

30 mmol 3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran werden in 30 ml abs Methylenchlorid suspendiert. Es werden nacheinander 60 mmol Imidazol und 60 mmol t. -Butyldimethysilylchlorid zugegeben. Nach 14 h Rühren bei Raumtemp. wird filtriert. Das Filtrat wird nacheinander mit je 100 ml 1M-Natronlauge, 100 ml 1M-Salzsäure und 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die abgetrennte organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel:Petroläther) getrennt.

Ausbeute 27 mmol

Beispiel 18

Dinatriumsalz von 3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-phosphoryl-2,2-dimethyl-benzofuran

Eine Lösung von 30 mmol 3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran in einer Mischung von 30 ml Aceton und 30 ml Pyridin wird unter Rühren bei 0°C zu einer Lösung von 15 ml Phosphoroxychlorid in 75 ml Aceton getropft. Es wird 1 h bei 0°C gerührt und anschließend auf 600 ml gesättigte Kochsalzlösung gegossen und abgesaugt. Der Rückstand wird in 15 ml Wasser suspendiert. Mit 2M-Natronlauge wird ein pH-Wert von 10 eingestellt. Es wird mit 300 ml Ethanol versetzt und abgesaugt. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 23 mmmol

Beispiel 19

3-(7'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)
-4-spiro-(5"-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 10 mmol 3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-t.-butyldimethylsilyloxy-2,2-dimethyl-benzofuran gelöst in 200 ml abs. Methylenchlorid in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 20 mmol

Beispiel 20

Dinatriumsalz des 3-(7'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)
-4-spiro-(5"-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 2 mmol Dinatriumsalz von 3-(5'-Chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-7-phosphoryl-2,2-dimethyl-benzofuran gelöst in 20 ml abs. Methanol in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 2 mmol

Beispiel 21

5-Hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-on

80 mmol t-Butylhydrochinon werden zusammen mit 80 mmol Kaliumbromat in 100 ml Wasser aufgeschlämmt. Dazu werden unter Rühren 20 Tropfen 1M-Schwefelsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wird langsam unter Rühren auf 80 °C erhitzt. Es entsteht eine klare orange Lösung des Chinons. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fallen orange Nadeln (t-Butylbenzochinon) aus. Diese werden noch feucht in 400 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wird bei 5 °C 15 h mit einer 250 W- Natriumdampflampe bestrahlt (DC-Kontrolle). Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand mit Toluol/Hexan 1 : 1 gewaschen. Der zurückbleibende farblose kristalline Rückstand (2-(2'-Ethyl-2'-ethoxy-propyl-)-hydrochinon) wird in eine Mischung von 4 ml Ethanol mit 80 ml Eisessig eingetragen. Unter Rühren werden 4 ml 40 % wäßrige Tetrafluorborsäure zugegeben. Die Mischung wird auf 80 °C erhitzt, wobei eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird auf 200 ml Wasser gegossen und mit Toluol extrahiert. Die organische Phase wird einmal mit Wasser gewaschen und über Kaliumcarbonat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleibt ein Öl zurück. (5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydro-benzofuran). Die Benzoylierung, Oxidation und Verseifung erfolgt wie oben unter Beispiel 15 beschrieben.

Ausbeute 25 mmol

Beispiel 22

6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-on

25 mmol 7-Hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-on wird mit 30 g Kieselgel in 200 ml Chloroform gerührt. Es wird eine Lösung von 25 mmol N-Chlor-diisopropylamin in 100 ml Chloroform (hergestellt aus Diisopropylamin und wäßriger Natriumhypochloridlösung, extrahiert in Chloroform, Konzentration iodometrisch bestimmt) zugetropft. Nach 10 h Rühren wird filtriert und das Filtrat mit Wasser ausgeschüttelt. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird bei 300 mbar abdestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Essigester) getrennt

Ausbeute 20 mmol

Beispiel 23

6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-thion

Eine Lösung von 20 mmol 6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-on in 30 ml Toluol wird mit 10 mmol Lawesson's-Reagenz versetzt und 3 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird über 50 g Kieselgel filtriert. Die rote Fraktion des Filtrats wird aufgefangen. Nach Abdestillieren des Toluols bleibt ein rotes Öl zurück.

Ausbeute 17 mmol

Beispiel 24

3-((E/Z)-)-6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-yliden)-androsta-1,4-dien-17-on

Unter Rühren bei Raumtemperatur wird 1 mmol Androsta-1-4-dien-3,17-dion-3-hydrazon zu einer Suspension von 1.5 g Mangandioxid und 1.5 g Aluminiumoxid in 20 ml Ether, der mit 10 Tropfen Wasser versetzt wurde, eingetragen. Nach einstündigem Rühren wird die etherische Lösung des Diazosteroids abfiltriert. Zum Filtrat wird portionsweise 1 mmol 6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-thion gegeben. Nach zweistündigem Rühren wird der Ether abdestilliert und der Rückstand über Kieselgel (Essigester/Petroläther 1 : 9) chromatographiert. Die schwach gelb gefärbten Fraktionen werden gesammelt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleibt ein leicht gelber, kristalliner Rückstand zurück.

Ausbeute 0.7 mmol

Beispiel 25

3-((E/Z)-)-6-Chlor-5-t-butyldimethylsilyloxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-yliden)-androsta-1,4-dien-17-on

30 mmol 3-(Androsta-1',4'-dien-17'-on-3'-yliden)-6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran werden in 30 ml abs Methylenchlorid suspendiert. Es werden nacheinander 60 mmol Imidazol und 60 mmol t. -Butyldimethysilylchlorid zugegeben. Nach 14 h Rühren bei Raumtemp. wird filtriert. Das Filtrat wird nacheinander mit je 100 ml 1M-Natronlauge, 100 ml 1M-Salzsäure und 20 ml Wasser ausgeschüttelt. Die abgetrennte organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der ölige Rückstand wird säulenchromatographisch (Kieselgel:Petroläther) getrennt.

Ausbeute 24 mmol

Beispiel 26

3-((E/Z)-)-6'-Chlor-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yliden)-androsta-1,4-dien-17-on-5'-yl-dinatriumphosphat

Eine Lösung von 30 mmol 3-(Androsta-1',4'-dien-17'-on-3'-yliden)-6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran in einer Mischung von 30 ml Aceton und 30 ml Pyridin wird unter Rühren bei 0°C zu einer Lösung von 15 ml Phosphoroxychlorid in 75 ml Aceton getropft. Es wird 1 h bei 0°C gerührt und anschließend auf 600 ml gesättigte Kochsalz gegossen und abgesaugt. Der Rückstand wird in 15 ml Wasser suspendiert. Mit 2M-Natronlauge wird ein pH-Wert von 10 eingestellt. Es wird mit 300 ml Ethanol versetzt und abgesaugt. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 23 mmol

Beispiel 27

(4'Ξ)-5"-t.-Butyldimethylsilyloxy-6"-Chlor-2",2"-dimethyl-17-oxo-(3ξO)-dispiro [androsta-1,4-dien-3,3'-[1,2]dioxetan-4',3"-benzofuran

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 10 mmol 3-(Androsta-1',4'-dien-17'-on-3'-yliden)-6-Chlor-5-t-butyldimethylsilyloxy-2,2-dimethyl-benzofuran gelöst in 20 ml abs. Methylenchlorid in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 2 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 20 mmol

Beispiel 28

(4'Ξ)-6"-Chlor-2",2"-dimethyl-17-oxo-(3ξO)-dispiro[androsta-1,4-dien-3,3'-[1,2]dioxetan-4',3"-benzofuran-5"-yl-dinatriumphosphat

Unter Einleitung von trockenem Sauerstoff werden 2 mmol Dinatriumsalz von 3-(Androsta-1',4'-dien-17'-on-3'-yliden)-6-Chlor-5-phosphoryl-2,2-dimethyl-benzofuran gelöst in 20 ml abs. Methanol in Gegenwart von 0.01 mol% immobilisiertem Rose Bengal 8 h bei - 30 °C mit einer 1000 Watt Natriumdampflampe bestrahlt. Die Umsetzung verläuft quantitativ. Der Sensitizer läßt sich durch Abfiltrieren entfernen. Das Filtrat enthält das Dioxetan.

Ausbeute 2 mmol

Analog bis zu den Beispielen 1 bis 28 konnten die entsprechenden Dioxetane auf Basis der folgenden Benzofuranderivate hergestellt werden:

5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydro-benzofuran,

5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydro-benzofuran-3-on,

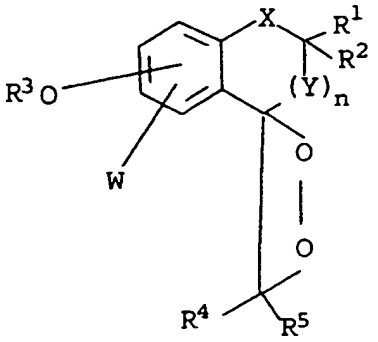
5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydro-benzofuran-3-thion,

6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-on sowie

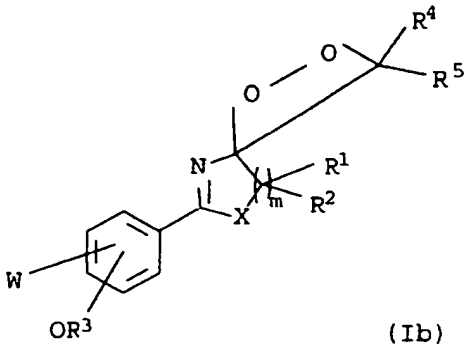
6-Chlor-5-hydroxy-2,2-dimethyl-benzofuran-3-thion.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel Ia oder Ib,



(Ia)



(Ib)

in der

R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Niederalkyl C_1 bis C_6, geradkettig oder verzweigt, jeweils oder zusammen eine Cycloalkyl- bzw. eine Arylgruppe, gegebenenfalls substituiert durch eine oder mehrere elektronenziehende Gruppen mit der Maßgabe darstellen, daß höchstens R^1 oder R^2 Wasserstoff ist,

m die Zahl 1 oder 2 bedeutet,

R^3 eine abspaltbare Gruppe bedeutet,

W Wasserstoff, Halogen oder ein Pseudohalogen,

mindestens eine der Gruppen R^4 oder R^5 eine die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe, wobei höchstens eine der Gruppen R^4 oder R^5 Wasserstoff darstellt,

und X oder Y Sauerstoff, N-R oder $C(R)_2$, wobei R die für R^1 bzw. R^2 angegebenen Bedeutungen haben oder eine Doppelbindung im mesomeren System darstellt, oder eine Carbonylgruppe darstellt, und n die Zahl 0 oder 1 bedeutet.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe R^4 oder R^5 ein kondensiertes aliphatisches oder aromatisches Ringsystem bedeutet, welches gegebenenfalls durch einen oder mehrere elektronenziehende Reste substituiert ist.

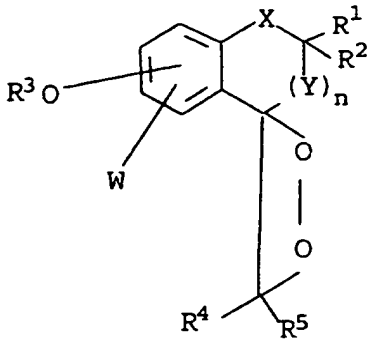
3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe ein Adamantyl-, Phenyl-, Cylohexyl-, sekundärer oder tertiärer Alkyl-, Polycycloalkyl- bzw. Polycycloarylrest, ein Steroidderivat oder ein Gemisch von letzteren ist.

4. Verbindungen nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest $-O-R^3$ das entsprechende Hydroxysalz, eine Oxysäure, Phosphat, Aryl- oder Alkylcarboxylester, Alkyloxy, Trialkyloxy oder Alkylsilyloxy, Arylsilyloxy, Sulfat, Oxypyranosid oder ein Glyceridyl- bzw. Phosphorylrest darstellt.

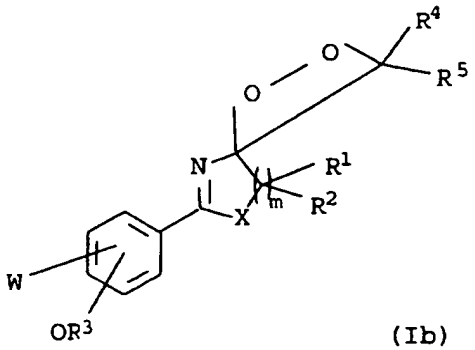
5. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Reste R^1 oder R^2 Wasserstoff, eine Methyl-, Ethyl- oder eine gegebenenfalls substituierte Phenylgruppe oder R^1 und R^2 zusammen mit $(C)_m$ und m gleich 2 eine gegebenenfalls substituierte Phenylengruppe bedeutet.

6. Verbindungen nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um 3-(7'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}] yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(7'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, 3-(7'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(7'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(5"-chlor-tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, 3-(5'-t.-Butyldimethylsilyloxy-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(5'-Phosphoryl-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, 3-(5'-t.-Butyldimethylsilyloxy-6'-chlor-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl) -4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetan, das Dinatriumsalz des 3-(5'-Phosphoryl-6'-chlor-2',2'-dimethyl-benzofuran-3'-yl)-4-spiro-(5"-chlor-tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]yl)-1,2-dioxetans, (4'Ξ)-5"-t.-Butyldimethylsilyloxy-6"-Chlor-2",2"-dimethyl-17-oxo-(3ξO)-dispiro[androsta-1,4-dien-3,3'-[1,2]dioxetan-4',3"-benzofuran oder (4'Ξ)-6"-Chlor-2",2"-dimethyl-17-oxo-(3ξO)-dispiro[androsta-1,4-dien-3,3'-[1,2]dioxetan-4',3"-benzofuran-5"-yl-dinatriumphosphat handelt.

7. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel Ia oder Ib

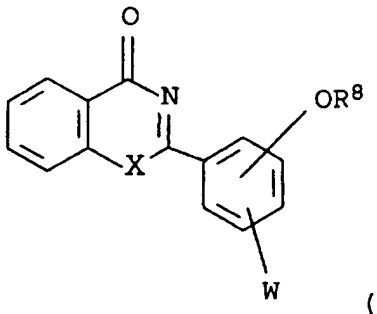


(Ia)

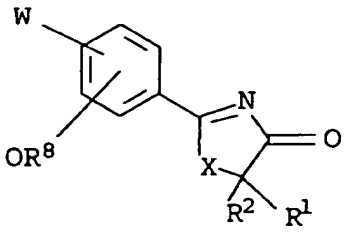


(Ib)

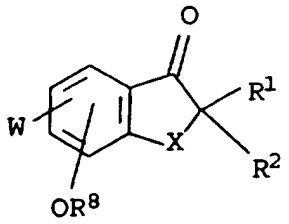
dadurch gekennzeichnet, daß eine der Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel II, III oder IV



(II)

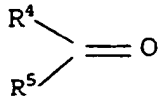


(III)



(IV)

mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V

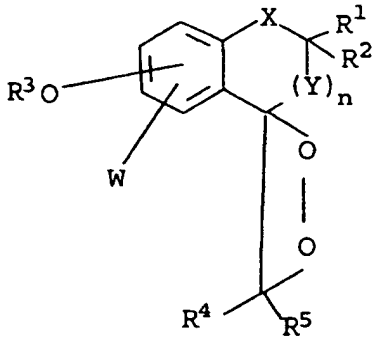


(V)

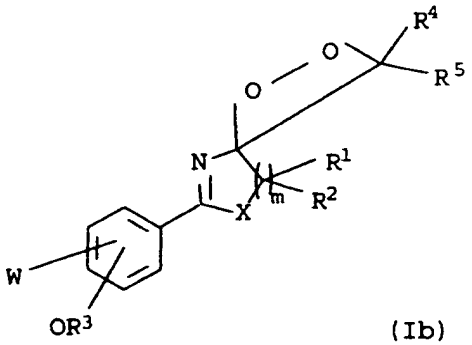
worin die Reste R^1 bis R^8, W, X, Y sowie m und n die jeweils bereits angegebenen Bedeutungen haben, in Gegenwart von Titantrichlorid und einem Reduktionsmittel umgesetzt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Reduktionsmittel Zink/ Kupfer oder Lithiumaluminiumhydrid verwendet wird.

9. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel Ia oder Ib

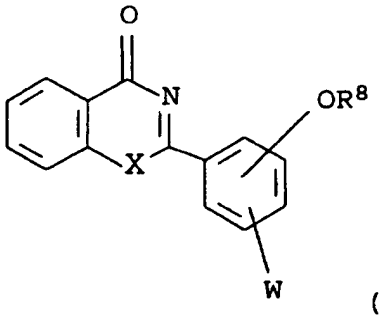


(Ia)

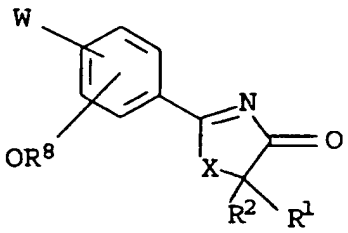


(Ib)

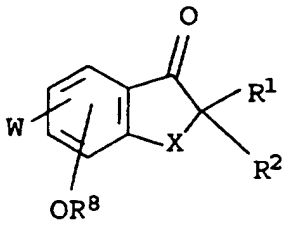
dadurch gekennzeichnet, daß eine der Verbindungen der allgemeinen Formeln II, III oder IV



(II)

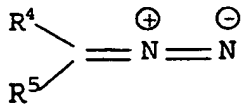


(III)



(IV)

zunächst in die entsprechende Thioncarbonylverbindung überführt wird und anschließend mit einer Diazoverbindung der allgemeinen Formel IX



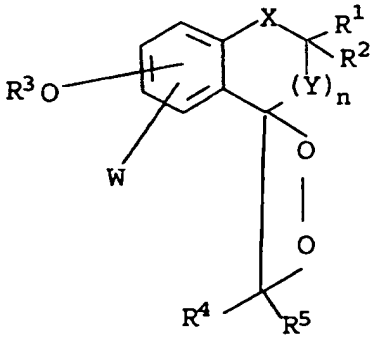
(IX)

worin die Reste R^1 bis R^8, W, X, Y sowie m und n die jeweils bereits angegebenen Bedeutungen haben, umgesetzt, dealkyliert, die abspaltbare Gruppe R^3 eingeführt und dioxygeniert wird.

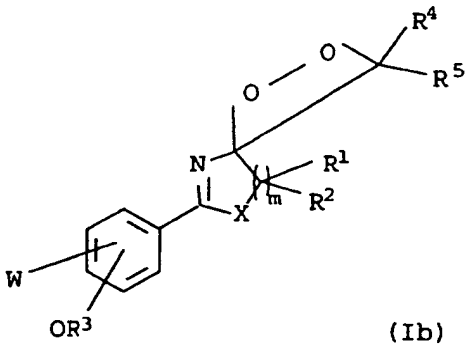
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Umwandlung der Carbonyl- in die Thiocarbonylfunktion in Gegenwart eines Schwefelreagenzes oder von Phosphopentasulfid erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Diazoverbindung, Diazoadamantan, Chlordiazoadamantan, Diphenyldiazomethan, polycyclische Diazoverbindungen, sekundäre oder tertiäre Ketone bzw. Aldehyde, die gegebenenfalls substituiert sein können, verwendet.

12. Verfahren zur Bestimmung einer Säure, Base, eines Salzes, Enzyms, anorganischen oder organischen Katalysators oder Elektronendonors durch Umsetzung dieses Analyten mit einer Verbindung der allgemeinen Formel Ia oder Ib,



(Ia)



(Ib)

in denen

R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Niederalkyl C_1 bis C_6, geradkettig oder verzweigt, jeweils oder zusammen eine Cycloalkyl- bzw. eine Arylgruppe, gegebenenfalls substituiert durch eine oder mehrere elektronenziehende Gruppen mit der Maßgabe darstellen, daß höchstens R^1 oder R^2 Wasserstoff ist,

m die Zahl 1 oder 2 bedeutet,

R^3 eine abspaltbare Gruppe bedeutet,

W Wasserstoff, Halogen oder ein Pseudohalogen,

mindestens eine der Gruppen R^4 oder R^5 eine die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe, wobei höchstens eine der Gruppen R^4 oder R^5 Wasserstoff darstellt,

und X oder Y Sauerstoff, N-R oder $C(R)_2$, wobei R die für R^1 bzw. R^2 angegebenen Bedeutungen haben oder eine Doppelbindung im mesomeren System darstellt, oder eine Carbonylgruppe darstellt, und n die Zahl 0 oder 1 bedeutet, Abspaltung der Gruppe R^3 und Messung des emittierten Lichts als Maß für den Gehalt an der zu bestimmenden Verbindung.

13. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 6 in immunologischen Assays oder zur DNA-Diagnostik.

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07D 493/10, G01N 33/533, C07F 7/18, 9/38,C07J 1/00, C07D 491/10, 498/10 — **A3**

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/14696

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. April 1997 (24.04.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04506

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Oktober 1996 (17.10.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 38 708.2 18. Oktober 1995 (18.10.95) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HEINDL, Dieter [DE/DE]; Hohenschwangaustrasse 37, D-81549 München (DE). JOSEL, Hans-Peter [DE/DE]; Prälatenweg 7, D-82362 Weilheim (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23, D-82362 Weilheim (DE). HÖLTKE, Hans-Joachim [DE/DE]; Henlestrasse 2, D-82377 Penzberg (DE). BECKERT, Rainer [DE/DE]; Am Mühlhügel 16, D-07751 Jena-Wogau (DE). WEISS, Dieter [US/DE]; Clara-Zetkin-Strasse 1, D-07743 Jena (DE). ADAM, Waldemar [DE/DE]; Lerchenhain 4, D-97074 Würzburg (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

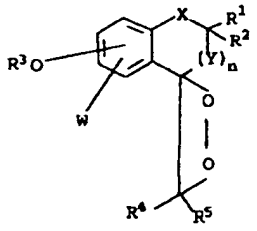
(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 5. Juni 1997 (05.06.97)

(54) Title: HETEROCYCLIC DIOXETHANE SUBSTRATES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USE IN ENZYMATIC ASSAY TECHNIQUES.

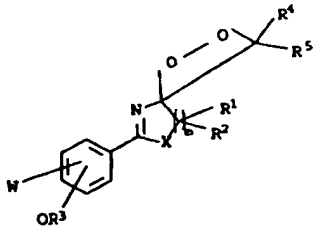
(54) Bezeichnung: HETEROCYCLISCHE DIOXETAN-SUBSTRATE, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND VERWENDUNG IN ENZYMATISCHEN ANALYSEVERFAHREN.

(57) Abstract

The invention concerns compounds of general formulae (Ia) and (Ib), in which R^1 and R^2, which may be identical or different, designate hydrogen, C_1-C_6 lower alkyl, straight-chain or branched, or an aryl group, optionally substituted by electron-attracting groups, R^3 means a cleavable group, W designates hydrogen, halogen or a pseudohalogen, at least one of the groups R^4 and R^5 designates a group stabilizing the dioxethane structure, at most one of the groups R^4 and R^5 designating hydrogen, and X or Y designating oxygen, N-R or $C(R)_2$, R having the meanings given for R^1 or R^2, or a mesomeric double bond or a carbonyl group, and n being 0 or 1 and m being 1 or 2. The invention further concerns a process for preparing these compounds. The compounds are novel and can be used as substrates in immunological assays and DNA diagnoses using colour-forming activating agents.



(Ia)



(Ib)

(57) Zusammenfassung

Es werden Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia) and (Ib), in der R^1 und R^2 gleich oder verschieden, Wasserstoff, Niederalkyl C_1 bis C_6, geradkettig oder verzweigt, oder eine Arylgruppe, gegebenenfalls substituiert durch elektronenziehende Gruppen, darstellen, R^3 eine abspaltbare Gruppe bedeutet, W Wasserstoff, Halogen oder ein Pseudohalogen, mindestens eine der Gruppen R^4 oder R^5 eine die Dioxetanstruktur stabilisierende Gruppe, wobei höchstens eine der Gruppen R^4 oder R^5 Wasserstoff darstellt, und X oder Y Sauerstoff, N-R oder $C(R)_2$, wobei R die für R^1 bzw. R^2 angegebenen Bedeutungen haben oder eine mesomere Doppelbindung oder eine Carbonylgruppe darstellt, und n die Zahl 0 oder 1 bzw. m die Zahl 1 oder 2 bedeutet, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung beschrieben. Diese Verbindungen sind neu und als Substrate in immunologischen Assays und in der DNA-Diagnostik unter Verwendung von aktivierenden Agentien zur Farbbildung verwendbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MX**	Mexiko
AT	Österreich	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
AU	Australien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BB	Barbados	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BE	Belgien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BF	Burkina Faso	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BG	Bulgarien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BJ	Benin	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
BR	Brasilien	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
BY	Belarus	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CA	Kanada	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KR**	Republik Korea	**SG**	Singapur
CG	Kongo	**KZ**	Kasachstan	**SI**	Slowenien
CH	Schweiz	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CM	Kamerun	**LR**	Liberia	**SZ**	Swasiland
CN	China	**LK**	Litauen	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
EE	Estland	**MG**	Madagaskar	**UG**	Uganda
ES	Spanien	**ML**	Mali	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**MN**	Mongolei	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MR**	Mauretanien	**VN**	Vietnam
GA	Gabon	**MW**	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/04506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07D493/10 G01N33/533 C07F7/18 C07F9/38 C07J1/00
C07D491/10 C07D498/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07D G01N C07F C07J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 10258 A (ABBOTT LABORATORIES) 11 May 1994 see claim 1	1-13
A	WO 93 20083 A (BOEHRINGER MANNHEIM) 14 October 1993 cited in the application see claim 1	1-13
A	DE 42 10 759 A (BOEHRINGER MANNHEIM) 7 October 1993 see claim 1	1-13
A	US 5 112 960 A (BRONSTEIN) 12 May 1992 see claim 1	1-13

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 April 1997	24.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gettins, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/04506

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 473 984 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 11 March 1992 see claim 1	1-13
A	EP 0 379 716 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 1 August 1990 see claim 1	1-13
A	WO 90 07511 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 12 July 1990 cited in the application see claim 1	1-13
A	EP 0 352 713 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 31 January 1990 cited in the application see claim 1	1-13
A	EP 0 254 051 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 27 January 1988 cited in the application see claim 1	1-13

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 96/04506

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims : 1-13 Compounds Ia
Claims : 1-13 Compounds Ib

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 96/04506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9410258 A	11-05-94	US 5603868 A	18-02-97
		AU 5451194 A	24-05-94
		EP 0666891 A	16-08-95
		JP 8502968 T	02-04-96
		US 5607625 A	04-03-97
WO 9320083 A	14-10-93	DE 4210759 A	07-10-93
		EP 0591489 A	13-04-94
		JP 6102669 B	14-12-94
		JP 6503844 T	28-04-94
		US 5455357 A	03-10-95
DE 4210759 A	07-10-93	WO 9320083 A	14-10-93
		EP 0591489 A	13-04-94
		JP 6102669 B	14-12-94
		JP 6503844 T	28-04-94
		US 5455357 A	03-10-95
US 5112960 A	12-05-92	AU 656927 B	23-02-95
		AU 8871491 A	30-03-92
		CA 2069957 A	01-03-92
		EP 0497972 A	12-08-92
		JP 2552413 B	13-11-96
		JP 5503714 T	17-06-93
		OA 9659 A	15-05-93
		US 5547836 A	20-08-96
		US 5538847 A	23-07-96
		WO 9204341 A	19-03-92
		US 5582980 A	10-12-96
		US 5543295 A	06-08-96
		US 5330900 A	19-07-94
		US 5326882 A	05-07-94
		US 4956477 A	11-09-90
		US 5177241 A	05-01-93
EP 473984 A	11-03-92	AU 4153293 A	30-09-93
		AU 640514 B	26-08-93
		AU 8279391 A	11-06-92
		CA 2050076 A	08-03-92
		CN 1059523 A	18-03-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 96/04506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 473984 A		JP 2572171 B	16-01-97
		JP 7118260 A	09-05-95
		KR 9409534 B	14-10-94
EP 379716 A	01-08-90	AT 135353 T	15-03-96
		CA 2006222 A	27-06-90
		DE 68925963 D	18-04-96
		DE 68925963 T	24-10-96
		JP 3505739 T	12-12-91
		WO 9007511 A	12-07-90
		US 5438146 A	01-08-95
		US 5068339 A	26-11-91
		US 4983779 A	08-01-91
WO 9007511 A	12-07-90	AT 135353 T	15-03-96
		CA 2006222 A	27-06-90
		DE 68925963 D	18-04-96
		DE 68925963 T	24-10-96
		EP 0379716 A	01-08-90
		JP 3505739 T	12-12-91
		US 5438146 A	01-08-95
		US 5068339 A	26-11-91
		US 4983779 A	08-01-91
EP 352713 A	31-01-90	US 5004565 A	02-04-91
		AU 603736 B	22-11-90
		AU 3664589 A	01-02-90
		CN 1040980 A	04-04-90
		CN 1088956 A	06-07-94
		DE 68909345 D	28-10-93
		DE 68909345 T	13-01-94
		EP 0510721 A	28-10-92
		EP 0518387 A	16-12-92
		ES 2013226 T	16-11-94
		JP 6070797 A	15-03-94
		JP 7121237 B	25-12-95
		JP 2069590 A	08-03-90
		JP 7091536 B	04-10-95
		US 4959182 A	25-09-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 96/04506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 254051 A	27-01-88	AT 110722 T	15-09-94
		AT 145901 T	15-12-96
		DE 3750448 D	06-10-94
		DE 3750448 T	15-12-94
		DE 3751973 D	16-01-97
		EP 0595369 A	04-05-94
		ES 2001741 T	01-01-95
		ES 2094991 T	01-02-97
		JP 63093777 A	25-04-88
		JP 8134061 A	28-05-96
		JP 9040665 A	10-02-97
		US 5438146 A	01-08-95
		US 5004565 A	02-04-91
		US 4857652 A	15-08-89
		US 4962192 A	09-10-90
		US 4959182 A	25-09-90
		US 5068339 A	26-11-91
		US 5013827 A	07-05-91
		US 4983779 A	08-01-91
		US 5386017 A	31-01-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04506

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07D493/10 G01N33/533 C07F7/18 C07F9/38 C07J1/00
C07D491/10 C07D498/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07D G01N C07F C07J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 10258 A (ABBOTT LABORATORIES) 11.Mai 1994 siehe Anspruch 1 ---	1-13
A	WO 93 20083 A (BOEHRINGER MANNHEIM) 14.Oktober 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1 ---	1-13
A	DE 42 10 759 A (BOEHRINGER MANNHEIM) 7.Oktober 1993 siehe Anspruch 1 ---	1-13
A	US 5 112 960 A (BRONSTEIN) 12.Mai 1992 siehe Anspruch 1 --- -/--	1-13

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9.April 1997	24.04.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	**Bevollmächtigter Bediensteter** Gettins, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04506

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 473 984 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 11.März 1992 siehe Anspruch 1	1-13
A	EP 0 379 716 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 1.August 1990 siehe Anspruch 1	1-13
A	WO 90 07511 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 12.Juli 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1	1-13
A	EP 0 352 713 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 31.Januar 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1	1-13
A	EP 0 254 051 A (THE BOARD OF GOVERNORS OF WAYNE STATE UNIVERSITY) 27.Januar 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1	1-13

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ternationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04506

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Patentansprüche : 1-13 Verbindungen Ia
Patentansprüche : 1-13 Verbindungen Ib

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☒ Die Zahlung zusatzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04506

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9410258 A	11-05-94	US 5603868 A	18-02-97
		AU 5451194 A	24-05-94
		EP 0666891 A	16-08-95
		JP 8502968 T	02-04-96
		US 5607625 A	04-03-97
WO 9320083 A	14-10-93	DE 4210759 A	07-10-93
		EP 0591489 A	13-04-94
		JP 6102669 B	14-12-94
		JP 6503844 T	28-04-94
		US 5455357 A	03-10-95
DE 4210759 A	07-10-93	WO 9320083 A	14-10-93
		EP 0591489 A	13-04-94
		JP 6102669 B	14-12-94
		JP 6503844 T	28-04-94
		US 5455357 A	03-10-95
US 5112960 A	12-05-92	AU 656927 B	23-02-95
		AU 8871491 A	30-03-92
		CA 2069957 A	01-03-92
		EP 0497972 A	12-08-92
		JP 2552413 B	13-11-96
		JP 5503714 T	17-06-93
		OA 9659 A	15-05-93
		US 5547836 A	20-08-96
		US 5538847 A	23-07-96
		WO 9204341 A	19-03-92
		US 5582980 A	10-12-96
		US 5543295 A	06-08-96
		US 5330900 A	19-07-94
		US 5326882 A	05-07-94
		US 4956477 A	11-09-90
		US 5177241 A	05-01-93
EP 473984 A	11-03-92	AU 4153293 A	30-09-93
		AU 640514 B	26-08-93
		AU 8279391 A	11-06-92
		CA 2050076 A	08-03-92
		CN 1059523 A	18-03-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04506

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 473984 A		JP 2572171 B	16-01-97
		JP 7118260 A	09-05-95
		KR 9409534 B	14-10-94
EP 379716 A	01-08-90	AT 135353 T	15-03-96
		CA 2006222 A	27-06-90
		DE 68925963 D	18-04-96
		DE 68925963 T	24-10-96
		JP 3505739 T	12-12-91
		WO 9007511 A	12-07-90
		US 5438146 A	01-08-95
		US 5068339 A	26-11-91
		US 4983779 A	08-01-91
WO 9007511 A	12-07-90	AT 135353 T	15-03-96
		CA 2006222 A	27-06-90
		DE 68925963 D	18-04-96
		DE 68925963 T	24-10-96
		EP 0379716 A	01-08-90
		JP 3505739 T	12-12-91
		US 5438146 A	01-08-95
		US 5068339 A	26-11-91
		US 4983779 A	08-01-91
EP 352713 A	31-01-90	US 5004565 A	02-04-91
		AU 603736 B	22-11-90
		AU 3664589 A	01-02-90
		CN 1040980 A	04-04-90
		CN 1088956 A	06-07-94
		DE 68909345 D	28-10-93
		DE 68909345 T	13-01-94
		EP 0510721 A	28-10-92
		EP 0518387 A	16-12-92
		ES 2013226 T	16-11-94
		JP 6070797 A	15-03-94
		JP 7121237 B	25-12-95
		JP 2069590 A	08-03-90
		JP 7091536 B	04-10-95
		US 4959182 A	25-09-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04506

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 254051 A	27-01-88	AT 110722 T	15-09-94
		AT 145901 T	15-12-96
		DE 3750448 D	06-10-94
		DE 3750448 T	15-12-94
		DE 3751973 D	16-01-97
		EP 0595369 A	04-05-94
		ES 2001741 T	01-01-95
		ES 2094991 T	01-02-97
		JP 63093777 A	25-04-88
		JP 8134061 A	28-05-96
		JP 9040665 A	10-02-97
		US 5438146 A	01-08-95
		US 5004565 A	02-04-91
		US 4857652 A	15-08-89
		US 4962192 A	09-10-90
		US 4959182 A	25-09-90
		US 5068339 A	26-11-91
		US 5013827 A	07-05-91
		US 4983779 A	08-01-91
		US 5386017 A	31-01-95